云 南 植 物 研 究 1993; **15** (1): 67—70
Acta Botanica Yunnanica

云南野生和栽培香菇原生质体的电融合*

张鉴铭 郑玉萍 陈梅英
(中国科学院昆明植物研究所，昆明 650204)

摘要 从云南野生和栽培香菇的单核菌丝分离了原生质体，使用了 500 kHz，400 pv／cm 的正弦波电场及 50 μs，5000 pv／cm 的方形脉冲使其融合。融合的原生质体培养 10—15 天形成菌落。用显微镜检查菌丝锁状联合的方法选出从融合子长出的菌株。融合菌株产生的频率为 11.43%。融合菌株表现出对亲本的拮抗作用及不同于亲本的过氧化物酶和酯酶的同工酶谱。用木屑料袋栽了 14 个融合菌株结出了子实体，这些子实体表现了双亲的某些特性及变异特征。为将来选择优良的融合菌株提供了可能。

关键词 香菇；原生质体；电融合

PROTOPLAST ELECTROFUSION OF YUNNAN WILD AND CULTIVATED LENTINUS EDODES

ZHANG Jiag–Ming，ZHENG Yu–Ping，CHEN Mei–Ying
(*Kunming Institute of Botany*，*Academia Sinica* Kunming 650204)

Abstract Protoplasts isolated from monokaryon mycelia of wild *Lentinus edodes* in Yunnan and cultivar of *Lentinus edodes* were fused by applying electric field of sine wave 500kHz, 400pv／cm and square pulse 50μs, 5000pv／cm. Fused protoplasts were cultured into colonies for 10—15 days. The colonies from fusants were selected by discovering clamp connection of hyphae under the light microscope. The frequency of regenerating strain from fusant was 11.43%. Fusant strains were demonstrated by that they appeared antagonistic action to their parents and different electrophoretogram of peroxidase and esterase isoenzyme from their parents. Fourteen strains from fusants were cultivated on sawdust substrate in plastic bag and gave fruitbody. Their fruitbodies appeared some feature as their parents and with variation in some characters. It is possible to be used for selecting a good variety in the future works.

Key words *Lentinus edodes*; Protoplast; Electrofusion

香菇是主要的食用菌之一，用原生质体融合技术选育香菇良种的研究也正在进行，已有通过 PEG 融合技术获得了香菇的融合菌株[1, 2]，但未见香菇原生质体电融合成功的报道。云南野生香菇结子实体较多，香味浓郁，但子实体较小不适于木屑料栽培；栽培种 57 号香菇子实体肥大适于木屑料塑料袋栽培，但结子实体少，香味淡薄。希望通过融合能把二者的优良性状组合在一起。本文报道用电融合技术融合的云南野生香菇碧江种和栽培种 57 号香菇形成的融合菌株及其结菇的研究。

1991–09–11 收稿
* 国家自然科学基金及云南省科委应用基础基金资助项目

材料和方法

1. 菌种 BD为云南野生香菇（*Lentinus edodes*）碧江（Bj）种的单核菌株。从云南省碧江县采集的野生香菇的子实体经组织分离法获得纯种。特点是：低温型5—15℃结菇，结菇多，有2—3朵丛生，香味浓郁，菇形小，木屑料袋栽产量低。从栽培在段木上的子实体收集担孢子，用稀释的担孢子液植板培养，分离单个菌落，经多次显微检查菌丝无锁状联合，栽培不结菇而获得单核菌株。

5D为栽培种57号香菇（*Lentinus edodes*）的单核菌株。57号菌株是从7405香菇的原生质体再生形成的菌株中选出的结菇量较高的菌株。其特点是：高温型10—25℃结菇，菇形肥大，结菇数少单朵生，木屑袋栽产量高，但香味淡薄。从木屑袋栽的子实体收集担孢子，稀释担孢子液培养，经紫外线诱变，筛选生长较快的菌株，经多次显微检查菌丝无锁状联合，栽培不结菇而获得的单核菌株。

2. 原生质体的分离和培养 按照已经报道[3]的2号酶液的组份配制酶液及其分离方法进行原生质体分离。酶解后的原生质体悬浮液经G_2号砂心漏斗过滤除去未被酶解的菌丝碎片，离心2000 rpm／min 5分钟收集原生质体，用稳渗液再悬浮离心洗去酶液而获得较纯的原生质体，原生质体的培养按文献[3]方法进行，原生质体的再生频率按文献[4]方法计算。

3. 原生质体的电融合 根据Zimmermann等[5]的原理，照文献[6]报道的方法进行电融合。使用了500 kHz，400 pv／cm（峰值—伏特／厘米）的正弦波电场，使原生质体在两电极间发生电介质电泳移动而形成串珠，再加50 μS，5000 pv／cm方形脉冲电场3—5次诱导原生质膜击穿使原生质体发生融合。

4. 融合子的培养和筛选 按照文献[6]的方法培养融合处理后的悬浮液，分离单个菌落培养成菌株，在显微镜下检查菌丝，选出有锁状联合的菌株为融合菌株。根据有锁状联合的菌株数，照文献[6]的方法计算融合菌株产生的频率。

5. 拮抗试验 按照文献[6]的方法进行。

6. 同工酶分析 用聚丙烯酰胺垂直平板凝胶电泳法比较了融合菌株与亲本的发育时期相同的子实体的过氧化物酶和脂酶的同工酶谱[6]。

7. 栽培结菇试验 融合菌株栽培在配料为木屑39%，棉子壳39%，麦麸20%，蔗糖1%，$CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 1%（干重比）；水分为62%的33×17 cm聚丙烯塑料袋内作结菇试验。25℃下培养45天，菌丝长满塑料袋后，移入出菇棚内出菇，温度为冬季到春季的自然温度在0—27℃之间，空气相对湿度保持在70—90%。

结果和讨论

1. 原生质融合的显微观察

BD菌株原生质体的产量为1.82×10^6个原生质体／ml · 100 mg；5D菌株的产量是7.10×10^6个原生质体／ml · 100 mg。原生质体再生频率分别是1.76%和1.94%。原生质体在显微镜下观测多数为直径5 μm的球形，原生质体再生的方式与前报道[4]的相同。

融合实验的多次观察表明，原生质体形成串珠较适合的正弦波的频率是500 kHz，峰值电压为400 pv／cm。在这种电场作用下，原生质体从随机的散乱分布状态（图1：1）形成了串珠（图1：2）。串珠形成后，加50 μs，5000 pv／cm的方形波脉冲电场激发原生质体组成的串珠，使质膜发生可逆性的击穿而融合。在显微镜下可见加电脉冲的瞬间原生质体受压缩或跳动的情况以及原生质体发生融合的过程。加3—5个电脉冲后，部分原生质体融合成了大小不等的各种融合子（图1：3）。

2. 融合菌株的筛选和分析

（1）检查锁状联合选出融合子的菌株 电融合后的融合子和原生质体，培养10天后长成肉眼可见的菌落。显微镜检查了140个单菌落培养成的菌株，其中16株有锁状联合。融合菌株产生的频率为11.43%。

(2) 融合菌株与亲本菌株有不同程度的拮抗作用　例如，F_{16}融合菌株与各亲本菌株的拮抗反应是不同的（图1：4）；它与5D的拮抗反应强烈，在两种菌丝接触边缘菌丝已堆集形成凸起的分界线；与Bj，BD有明显的拮抗线；而与57则无明显的拮抗线，似乎未发生拮抗反应。其他的融合菌株，有的与57和Bj双核亲本菌株的拮抗反应较显著；有的与5D单核亲本菌株的拮抗反应较明显；有的与BD单核亲本菌株的拮抗反应明显。未发现与4个亲本菌株的拮抗反应相同或者都没有拮抗作用的融合菌株。这说明融合菌株的遗传和生理特性的变化是多样的，提供了选择优良融合菌株的可能性。

(3) 融合菌株具有不同于双亲的同工酶谱　用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析了融合菌株相同发育时期子实体的过氧化物酶和酯酶的同工酶谱，它们的同工酶谱都不同于亲本的酶谱，既不同于双核亲本57和Bj子实体的同工酶谱，也不同于单核亲本5D和BD菌丝体的同工酶谱。有的融合菌株的一些酶带迁移率反映亲本菌株某些酶带迁移率，但不完全相同。融合菌株子实体的过氧化物同工酶带至少有5种不同类型（图1：5）；酯酶同工酶带至少有4种不同类型（图1：6），它们都不同于亲本酶带。

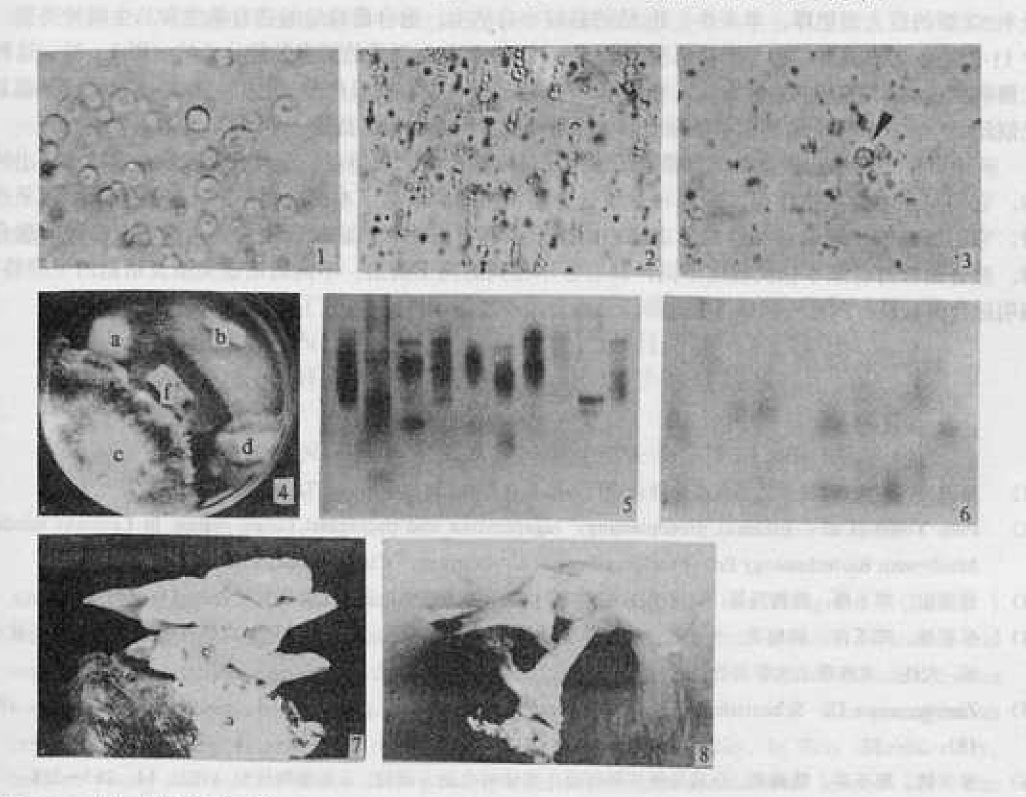


图1　1. 未加电场的原生质体（×246）；2. 加正弦波电场后电介质电泳聚集成的原生质体串珠（×133）；3. 加方形单脉冲后形成的融合子（×133）；4. 融合菌株与亲本的拮抗作用（a. 57；b. Bj；c. 5D；d. BD；f. 融合菌株）；5. 过氧化物同工酶谱（从左至右：1. 57；2. 5D；3—8.融合菌株；9. BD；10. Bj；2. 9. 单核菌丝；6. 酯酶同工酶谱（样品编号同5）；7. 融合菌株生长的丛状子实体；8. 丛状子实体的分叉菌柄。

Fig.1　1.Protoplasts no applying a electric field　(×246)；2. Pearl chains of the protoplasts collected by dielectrophoresis with a sine wave electric field　(×133)；3. Fusants formed after applying single square pulses　(shown by ↓ ×133)；4. Antagonistic action of fusant strain and parents　(a. 57; b. Bj; c.5D; d. BD; f. fusant)；5. Electrophoretogram of peroxidase isoenzyme　(From left to right: 1.57; 2.5D; 3–8.fusants; 9 BD; 10. Bj; 2.9. monokaryon mycelia; 6. Electrophoretogram of esterase isoenzyme (sample No. same as 5)；7. Mass fruitbodies from fusant strain；8. Branch stalk of the mass fruitbody.

3. 融合菌株产生的子实体

用木屑料袋栽培法栽培了 14 个融合菌株，它们都结出了子实体，对栽培及结菇的情况与亲本 57 及 Bj 对照进行了观察研究。接种在袋料内的菌丝培养在 25℃下，各菌株生长的情况不同，但在 45 天后都长满了塑料袋，以后转入出菇棚，在冬季（0—18℃）和春季（10—27℃）的自然温度下观察了出菇的情况并研究了菇的形态。

（1）融合菌株结菇的温度幅度扩大　亲本 Bj 是低温型菌种，结菇温度为 5—18℃；而亲本 57 是高温型，结菇温度为 10—25℃。融合菌株则在不同的温度下都有结菇的菌株：有 3 株在 5—18℃结菇，另有 3 株在 10—27℃结菇，而有 8 株则在较广的温度范围 5—27℃下都能结菇。这样宽的温度范围都能结菇反应了双亲菌株结菇温度的综合特性。

（2）融合菌株子实体的形态反映双亲特性　融合菌株结出的菇大小在亲本 57 和 Bj 的菇大小之间。亲本 57 结的菇大而肥厚，单朵生；Bj 结的菇较小有丛生。融合菌株结的菇有单生和丛生两种类型：其中 11 个是单朵的类型；有 3 个是丛生型（图 1：7）。而丛生型菇的柄多数是分叉的（图 1：8）。这种分叉菌柄在亲本 57 的菇上是没有的；在亲本 Bj 的菌柄上也没有明显的分叉，只是在丛生菌柄的基部紧靠处似分叉样。这种分叉菌柄似乎是融合菌株特有的变异形态，但有待进一步研究。

云南野生香菇和栽培香菇单核菌丝的原生质体电融合后，利用双核菌丝有锁状联合的特点选出的菌株，它们与亲本有拮抗作用；酯酶和过氧化物同工酶的酶谱与亲本的酶谱不同，又具有亲本的某些酶带；它们结菇的生理特性和菇的形态都表现出双亲具有的性状，这就表明它们是这二个品种的融合菌株。融合菌株对各亲本拮抗程度不同；具有各不相同的同工酶谱、不同的结菇类型及结菇的生理特征。表明融合菌株具有多种变异性，为选择优良融合菌株提供了可能。

参 考 文 献

〔1〕 彭卫宪，陆大京．用灭活原生质体融合进行高温香菇育种．真菌学报 1987；**6**（3）：184—192

〔2〕 Pam Yinjie et al . Efficient protoplasting／regeneration and protoplast fusion system in Lentinus edodes. Mushroom Biotechnology Ed. Fan Qingsheng et al. Nanjing, China JSTEC 1989; 285—294

〔3〕 张鉴铭，郑玉萍，陈梅英等．尖顶羊肚菌原生质体的分离及再生．云南植物研究 1989；**11**：449—452

〔4〕 张鉴铭，郑玉萍，陈梅英．云南野生香菇原生质体的分离和再生．见：朱世瑛，卢铁栋主编，食用菌新技术汇编．大连：大连理工大学出版社，1990：28—30

〔5〕 Zimmermann U, Scheurich P. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta* 1981; **151**: 26—32

〔6〕 张鉴铭，郑玉萍，陈梅英．香菇和侧耳属间原生质体的电融合研究．云南植物研究 1992；**14**：283—288